

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 623 206**

(21) N° d'enregistrement national :

**87 15765**

(51) Int Cl<sup>4</sup> : C 12 N 15/00.

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 16 novembre 1987.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : Bruno Patrick COLOMB. — FR.

(72) Inventeur(s) : Bruno Patrick Colomb.

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 20 du 19 mai 1989.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) :

(54) Procédé d'injection d'embryons d'oiseaux dans des œufs réceptacles non fécondés pour la production d'oiseaux.

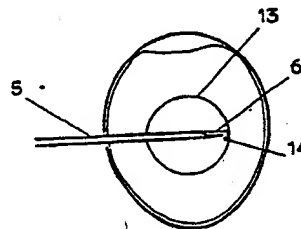
(57) L'invention concerne un procédé d'injection d'embryons  
d'oiseaux dans des œufs réceptacles non fécondés.

Il comprend un isolement et une croissance « In Vitro »  
d'embryons d'oiseaux obtenus par mutation génétique, dilacé-  
ration d'un disque germinatif fécondé, fécondation « In Vitro »  
d'ovocytes, transplatation nucléaire entre deux embryons, sépa-  
ration et reculture « In Vitro » de blastomères.

Des œufs réceptacles appartenant ou non à l'espèce ou à la  
famille de l'embryon injecté.

Un dispositif d'injection des embryons composé de deux  
aiguilles 5 6 fixées sur un dispositif permettant leur déplace-  
ment linéaire l'une par rapport à l'autre 11, lui-même fixé sur le  
bras d'un micromanipulateur permettant le prélèvement des  
embryons dans leur milieu de culture et leur injection dans le  
jaune 14 de l'œuf réceptacle.

Le procédé selon l'invention est destiné à la multiplication  
rapide de souches de volaille ou d'oiseaux appartenant à des  
espèces rares et/ou en voie de disparition.



FR 2 623 206 - A1

-1-

La présente invention a trait à la Biologie et concerne la production d'oiseaux par un procédé d'injection d'embryons dans des oeufs non fécondés et plus précisément, le procédé associe les étapes suivantes qui sont: l'utilisation d'embryons d'oiseaux pouvant être d'origines diverses, en vue de leur croissance "In Vitro", l'injection d'un ou plusieurs embryons par oeuf spécialement choisi et préparé pour servir de matrice réceptacle, la poursuite du développement embryonnaire par incubation naturelle ou artificielle jusqu'à éclosion.

10 L'invention peut être appliquée dans les domaines de l'Agriculture pour la multiplication rapide de souches de volailles obtenues par croisement ou manipulation génétique, dans les domaines de l'Aviculture et la Protection des Oiseaux pour la multiplication rapide d'oiseaux rares et/ou en voie de disparition.

Les prélèvements et transferts d'embryons ont été réalisés depuis très longtemps chez les mammifères et avec l'avènement des procédés de fécondation "In Vitro", ceux-ci sont maintenant réalisés couramment chez les hommes.

20 L'utilisation de tels procédés chez les oiseaux s'est heurtée à la différence fondamentale de Physiologie de la Reproduction entre les oiseaux et les mammifères.

L'ovule mature d'un oiseau est ce que l'on appelle le jaune d'oeuf et l'oeuf possède en lui-même tous les éléments nutritifs qui sont apportés chez les mammifères par l'utérus, pour assurer le développement de l'embryon.

Ce jaune ou ovule possède deux parties bien distinctes: Le disque germinatif qui possède les informations génétiques, et le jaune proprement dit qui correspond au cytoplasme de la cellule dans lequel se sont accumulés les éléments essentiels à la nutrition future de l'embryon. Après la ponte ovarienne, l'ovule se trouve successivement entouré d'albumine puis d'une coquille au cours de son passage dans l'oviducte pour donner l'oeuf d'oiseau. Si l'oeuf n'est pas fécondé juste après la ponte ovarienne, le cycle se poursuit de la même façon, mais l'information génétique contenue dans le disque germinatif aura dégénéré au moment de la ponte.

-2-

L'objet de la présente invention est d'utiliser ces oeufs non fécondés contenant toutes les matières nutritives destinées au développement de l'embryon et de leur injecter très précisément un ou plusieurs embryons étrangers.

5 Un embryon au premier stade de son développement est représenté par une cellule dite totipotentielle possédant la faculté de se diviser pour former un individu complet dans les conditions adéquates. Dans les premiers stades de division, l'embryon constitue une masse pleine appelée Morula, dont les  
10 cellules sont appelées Blastomères. Le passage au stade Blastula se caractérise par le début de creusement d'une cavité.

Les embryons utilisés dans la présente invention peuvent être produits: par mutation génétique, par isolement et culture des cellules totipotentielles recueillies dans le disque  
15 germinatif d'un oeuf fécondé non incubé ou incubé quelques heures, par fécondation "In Vitro" d'ovocytes par des spermatozoïdes par transplantation de noyaux de cellules embryonnaires ou de cellules germinales primordiales dans des cellules totipotentielles embryonnaires cultivées ensuite "In Vitro", par séparation et re-  
20 culture de Blastomères jusqu'au stade Morula ou Blastula. Selon l'invention, un grand nombre d'embryons, de quelques dizaines à plusieurs centaines, d'origine décrite ci-dessus, possédant soit le même code génétique, soit des codes génétiques différents et provenant de mutation ou non, peuvent être utilisés en quelques  
25 heures à quelques jours.

Selon l'invention, les embryons sont prélevés, sous microscope, du milieu qui les contient à l'aide d'une micro-  
pipette montée sur un micromanipulateur et chaque embryon est isolé dans le puits d'une boîte multitrous pour culture cellu-  
30 laire, puis mis en culture entre 37° Celcius et 41° Celcius jusqu'à l'obtention du stade Morula ou Blastula.

L'oeuf réceptacle impliqué dans le procédé d'invention aura des qualités particulières: Il devra être fraîchement pon-  
du ou conservé autour de 15° Celcius dans un lieu aéré et il  
35 pourra appartenir ou non à l'espèce ou à la famille génératrice de l'embryon. Dans le cas où l'oeuf appartiendrait à une espèce ou famille différente, il convient de choisir cette espèce ou famille la plus proche possible phylogénétiquement de celle de l'embryon. Si cela n'est pas réalisable,

-3-

le choix de l'espèce fournissant les oeufs réceptacles est fait en fonction des caractères physicochimiques des oeufs les plus approchants entre les deux espèces ou les deux familles, particulièrement le poids et le volume.

- 5 L'invention se caractérise donc par le fait qu'il est possible d'utiliser pour la production d'oiseaux d'espèces rares des oeufs appartenant à des espèces courantes.

Selon l'invention, après avoir été soigneusement lavée, la coquille(1) de l'oeuf receptacle est percée d'un trou(2) à 10 l'aide d'une miniperceuse munie d'une minimeule sans traverser la membrane coquillière(3). Le trou, de 1 mm à 3 mm de diamètre est fait préférentiellement au niveau de la zone équatoriale de l'oeuf. Un cache possédant une ouverture de 5 mm de diamètre est appliqué contre la coquille et une solution de plastique li- 15 quide est vaporisée sur l'ouverture. L'oeuf est ensuite mis à sécher verticalement pôle le plus large vers le haut.

Selon le procédé d'invention, le dispositif d'injection est composé d'un micromanipulateur, d'un jeu de deux ai-  
gilles(4) enfilées l'une dans l'autre et d'un microinjecteur.  
20 Le jeu d'aiguilles se compose d'une aiguille en acier(5) de diamètre intérieur compris entre 0,4 mm et 1 mm, de longueur comprise entre 1 cm et 15 cm dont une extrémité est affûtée en biseau; d'une aiguille en verre(6) de diamètre intérieur entre 0,2 mm et 0,8 mm et dont le diamètre extérieur lui permet de coulisser à 25 l'intérieur de l'aiguille en acier. L'extrémité sortant du côté du biseau de l'aiguille en acier est fermée et arrondie(7), une ouverture de 0,2 mm à 0,8 mm de diamètre est pratiquée sur la face latérale de l'extrémité inférieure de cette aiguille en verre(8).

30 Les deux aiguilles enfilées l'une dans l'autre sont fixées par deux points d'attache distincts(9)(10) à un dispositif permettant un déplacement linéaire de ces deux aiguilles l'une par rapport à l'autre(11). Ce dispositif est fixé sur le bras d'un micromanipulateur(12) de façon à ce qu'il puisse se 35 déplacer dans les trois axes. l'aiguille en verre est reliée au microinjecteur par une tubulure en polyéthylène remplie de paraffine liquide stérile et est remplie de milieu de culture stérile.

L'injection des oeufs selon l'invention est réalisée

-4-

de la façon suivante: La boîte contenant les embryons prêts à être injectés est placée sous le microscope, le micromanipulateur est fixé sur un des cotés du microscope et équipé des aiguilles comme décrit précédemment<sup>m</sup>. L'oeuf réceptacle est posé sur un portoir réglable en hauteur, pôle le plus large en haut, à côté des embryons. L'ouverture préparée comme décrit précédemment faisant face au micromanipulateur.

L'extrémité de l'aiguille en verre est dégagée de l'extrémité de l'autre aiguille et un ou plusieurs embryons sont aspirés sous contrôle de la vue dans un volume de 0,001 ml à 0,02 ml. L'aiguille en verre est alors rentrée sous la protection du biseau de l'aiguille en acier et l'ensemble est positionné en face de l'ouverture de l'oeuf(2) suivant un angle à peu près horizontal. Les deux aiguilles sont alors introduites délicatement à travers la membrane coquillière(3)(FIG 1) puis à travers la membrane vitelline(13). L'extrémité de l'aiguille en verre(6) est alors sortie du biseau de l'aiguille en acier(5) et la course des deux aiguilles poursuivie jusqu'à la rencontre de la face interne de la membrane vitelline(FIG 2). Sa situation est appréciée en fonction des longueurs d'aiguilles introduites dans l'oeuf et du diamètre moyen du jaune. Un appui important contre cette membrane sera sans conséquences graves car l'extrémité arrondie de l'aiguille en verre(7) n'aura pour effet que de déformer la membrane en la touchant, sans la percer.

Selon l'invention le ou les embryons sont injectés délicatement dans l'oeuf contre la face interne de la membrane vitelline(14) ou dans toute autre partie de jaune, dans un volume de 0,001 ml à 0,02 ml. Les aiguilles sont retirées suivant le trajet initial et l'orifice de la coquille(2) est immédiatement scellé par une goutte de mastic de silicone ou de paraffine de bougie liquéfiée à la chaleur.

L'exemple suivant illustre la mise en oeuvre du procédé selon l'invention à partir du disque germinatif d'un oeuf de poule fécondé.

Les oeufs de poule utilisés comme réceptacle qui selon l'invention auront été sélectionnés comme décrit précédemment sont soigneusement lavés à l'eau et brossés pour éliminer toute trace de souillure, séchés puis désinfectés à l'alcool. L'orifice est préparé comme décrit précédemment.

-5-

l'oeuf fécondé utilisé est nettoyé et stérilisé de la même façon que les oeufs réceptacles. Il est ouvert de façon stérile au dessus d'une boîte de Pétri stérile et le contenu y est transféré. A l'aide de pincettes stériles, le jaune est déplacé jusqu'à amener le disque germinatif à son sommet. Le disque est alors séparé du jaune avec ciseau et pincette stériles et placé dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture stérile. Le milieu de culture utilisé ici est du TC 199 contenant L Glutamine 0,2 mM, sérum de poulet inactivé 15%, Pénicilline 100 UI/ml, pH 7,4, 280 mosm.

Le disque germinatif est dilacéré mécaniquement à l'aide d'aiguilles stériles et les cellules sont examinées au microscope. Les cellules embryonnaires totipotentielles sont repérées par leur taille allant de 0,021 mm à 0,027 mm de diamètre avec un cytoplasme très dense et granuleux. Ces cellules sont séparées comme décrit précédemment et mises à incuber entre 37° Celcius et 41° Celcius pendant 1 heure à 6 heures en étuve de culture sous 95% air, 5% CO<sub>2</sub>. Les embryons qui se sont développés sont alors récupérés avec une micropipette et l'aide d'un micromanipulateur, regroupés par 5 ou 6 dans une boîte de Pétri contenant du milieu neuf et laissé à température ambiante.

Un ou plusieurs embryons sont injectés dans chaque oeuf réceptacle comme décrit précédemment et l'oeuf, une fois refermé, est placé horizontalement dans un incubateur entre 40° Celcius et 41° Celcius, orifice en bas, pendant 6 heures, puis dans un incubateur assurant une rotation de l'oeuf de 8 à 10 tours par heure pendant 18 heures à la même température.

Après ce délai, l'oeuf est sorti et peut être conservé comme un classique oeuf fécondé à 15° Celcius ou placé directement en incubateur classique à 37° Celcius pendant la durée nécessaire au développement complet de l'embryon.



-6-

## REVENDEICATIONS

1. Procédé d'injection d'embryons d'oiseaux dans des oeufs d'oiseaux réceptacles, destiné à la multiplication rapide de souches de volailles obtenues par croisement ou manipulation génétiques, ou d'oiseaux appartenant à des espèces rares et/ou en voie de disparition, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a, isolement et croissance "In Vitro" d'embryons obtenus par mutation génétique, par utilisation des cellules totipotentiellles d'un disque germinatif fécondé, par fécondation "In Vitro" d'ovocytes, par transplantation nucléaire entre deux embryons, par séparation et reculture "In Vitro" de Blastodermes appartenant à un embryon.

b, transplantation des embryons dans des oeufs réceptacles non fécondés appartenant ou non à l'espèce ou à la famille de l'embryon injecté.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le stade de développement des embryons impliqués dans l'invention va du stade Morula au stade Blastula.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les oeufs réceptacles appartenant à une espèce ou famille étrangère à l'embryon injecté ont des caractéristiques physicochimiques les plus approchantes de celles des oeufs appartenant à l'espèce de l'embryon, particulièrement au niveau du poids et du volume.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les oeufs réceptacles utilisés sont percés, avant l'injection, d'une ouverture dans la coquille sans ouverture de la membrane coquillière(2).

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le dispositif d'injection des embryons est composé de deux aiguilles(4) activées par un micromanipulateur permettant le prélèvement des embryons dans leur milieu de culture et leur injection dans le jaune, à proximité directe de la face interne de la membrane vitelline(14) ou à tout autre endroit du jaune de l'oeuf réceptacle.

6. Procédé selon les revendications 1 ou 5, caractérisé par le fait que le dispositif d'injection comprend deux aiguilles enfilées l'une dans l'autre(4).

-7-

7. Procédé selon l'une des revendications 1,5 ou 6, caractérisé par le fait que l'aiguille en acier(5) comprend une extrémité affûtée en biseau destiné au percement des membranes.

5 8. Procédé selon l'une des revendications 1,5 ou 6, caractérisé par le fait que l'aiguille en verre(6) est fermée et arrondie à son extrémité inférieure(7), et possède à cette même extrémité un orifice latéral(8) par lequel l'embryon peut circuler.

9. Procédé selon l'une des revendications 1,5 ou 6, 10 caractérisé par le fait que l'extrémité de l'aiguille en verre peut être indifféremment couverte et découverte par l'extrémité de l'aiguille en acier.

10. Procédé selon l'une des revendications 1, 5 ou 6, caractérisé par le fait que les deux aiguilles sont fixées en 15 deux points distincts(9)(10) sur un dispositif(11) assurant un déplacement linéaire des deux aiguilles l'une par rapport à l'autre, fixé lui-même sur le bras d'un micromanipulateur(12).

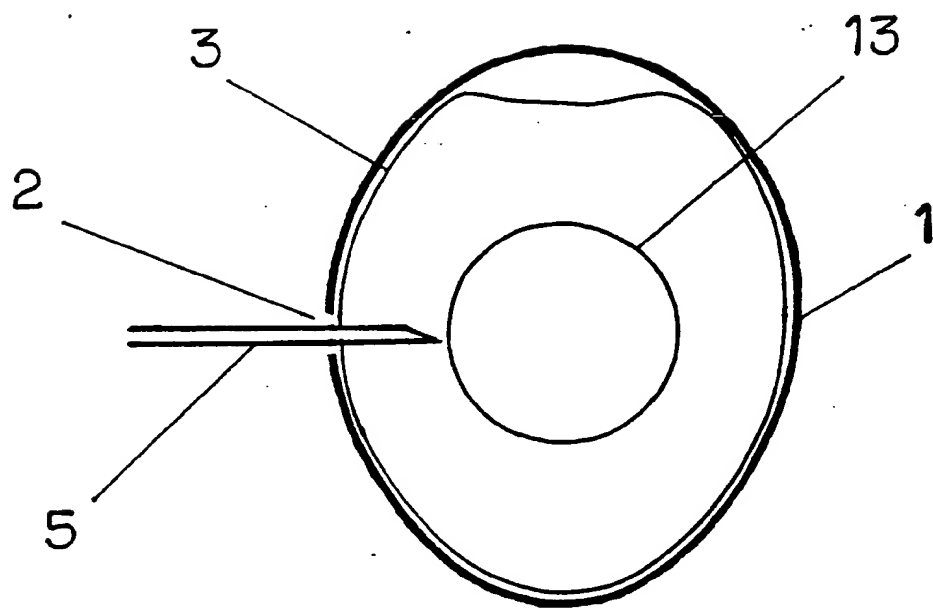


FIG 1

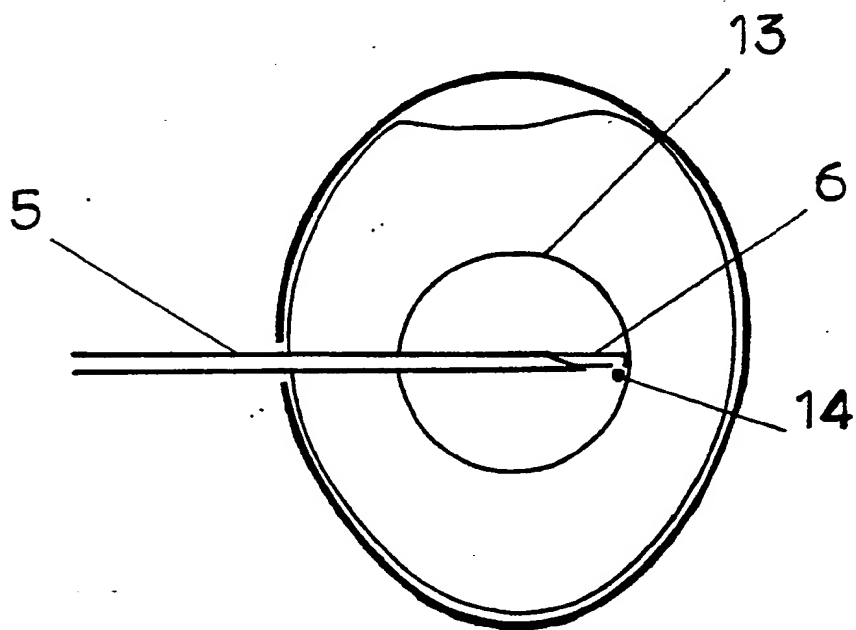
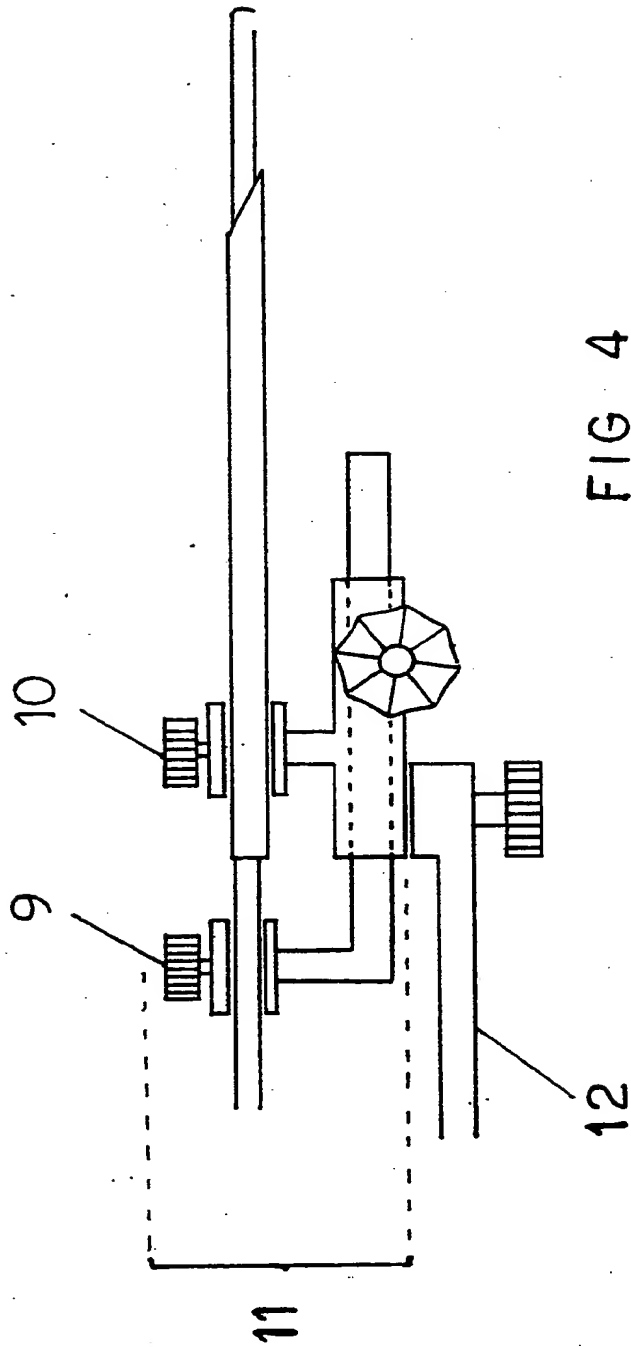
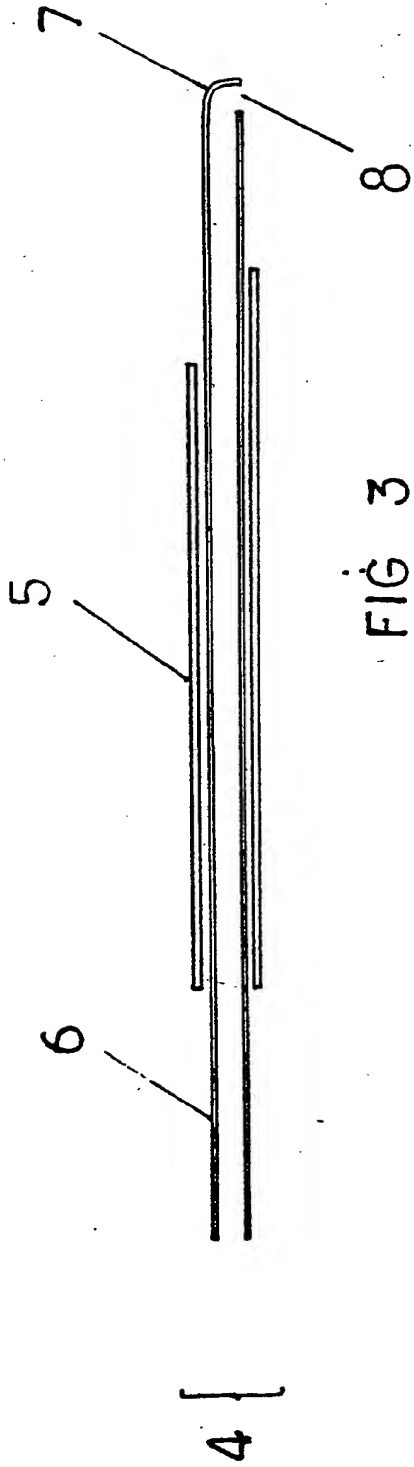


FIG 2



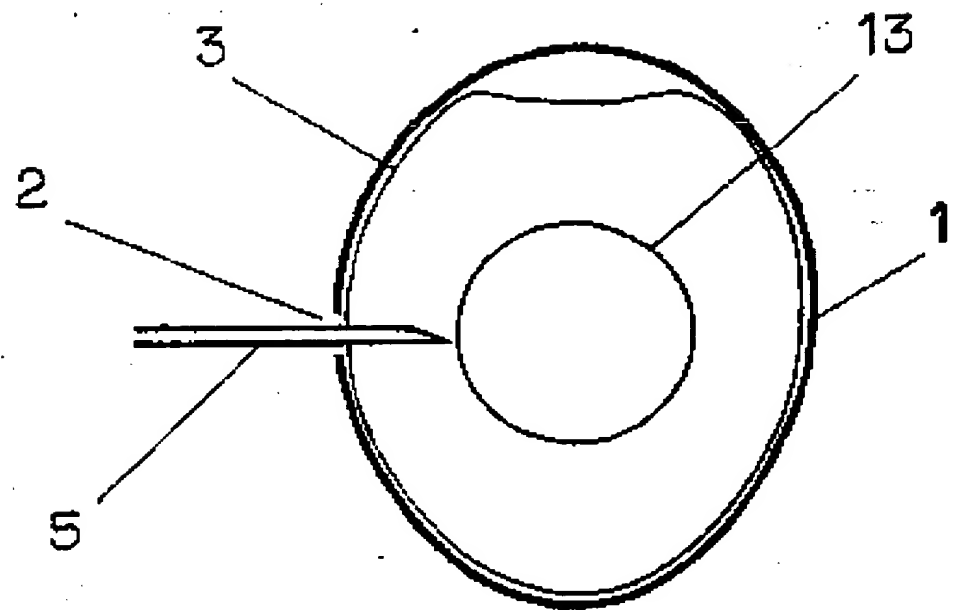


FIG 1

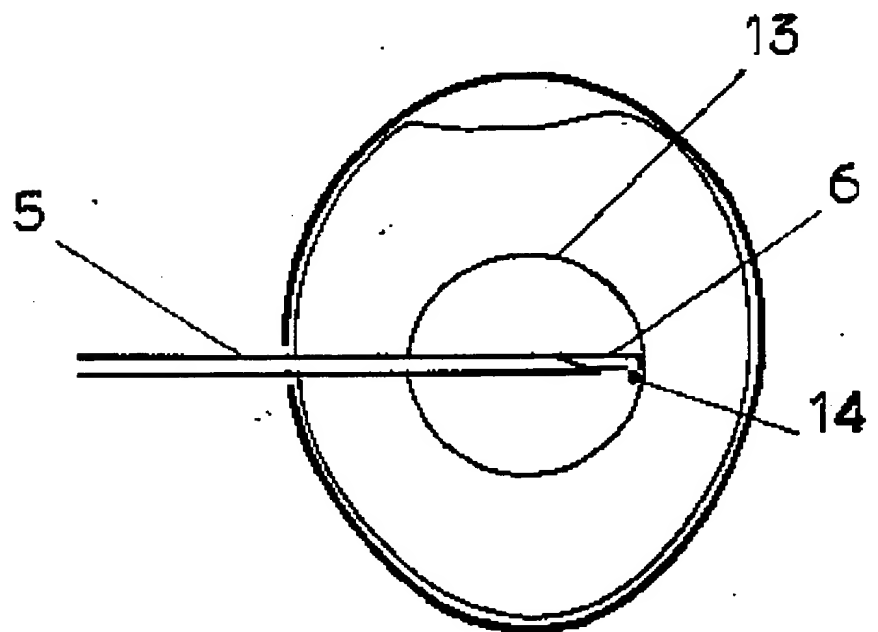


FIG 2

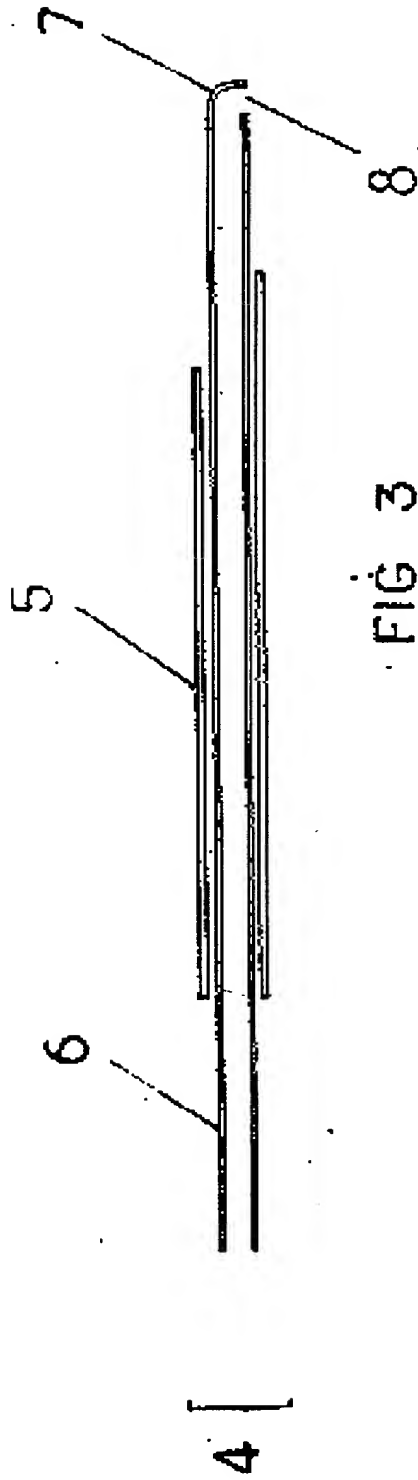


FIG 3

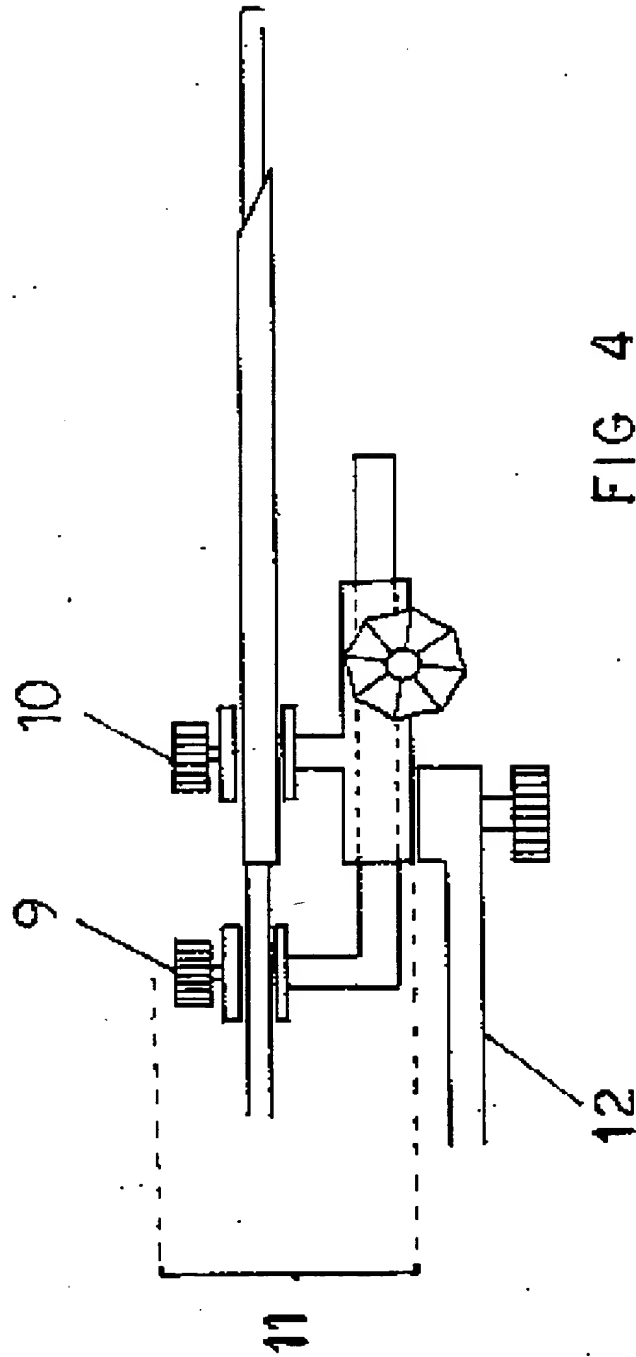


FIG 4